桃蛀螟实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选

杨 苓，胡晓静，徐志峰，何 林，肖 伟*

(西南大学植物保护学院，重庆 400716)

摘要：【目的】筛选特定条件下桃蛀螟 *Conogethes punctiferails* 稳定表达的内参基因，为桃蛀螟基因定量研究奠定基础。【方法】参考文献报道，并根据桃蛀螟转录组测序结果筛选出 β-肌动蛋白基因 *ACT*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 *GAPDH*、核糖体蛋白 49 基因 *RP*49、α-微管蛋白基因 *α-tub*、核糖体蛋白 L13 基因 *RPL*13 和液泡型 ATP 合酶基因 *V-ATPase* 等 6 个候选基因。再利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术测定 6 个候选基因在桃蛀螟不同发育时期和成虫不同组织中的表达量；然后通过 ΔCt 法，GeNorm，NormFinder，BestKeeper 和 RefFinder 5 个软件对 6 个候选基因的稳定性进行评估；最后以桃蛀螟嗅觉受体基因(olfactory receptor co-receptor, *Orco*)和性信息素结合蛋白基因(pheromone binding protein1, *PBP*1)为目的基因，验证 6 个候选基因分别在桃蛀螟不同发育时期和成虫不同组织中的的稳定性。【结果】ΔCt 法，GeNorm，NormFinder 和 BestKeeper 分析结果表明，4 个软件对 6 个候选基因稳定性的排序相似，在桃蛀螟不同发育时期和成虫不同组织中稳定性较高的 3 个基因为 *RP*49，*RPL*13 和 *GAPDH*；同时 4 个软件均判定 *ACT* 的稳定性最低。进一步利用 RefFinder 进行综合分析，结果显示，在桃蛀螟成虫不同组织中，最稳定的基因为 *RPL*13，其次为 *RP*49；而在不同发育时期，最稳定的基因为 *RP*49，其次为 *GAPDH*。另外经 GeNorm 软件计算得出，在桃蛀螟不同发育时期和成虫不同组织中桃蛀螟内参基因的最佳数目为 2。最后，以嗅觉受体基因 *Orco* 和 *PBP*1 为目的基因，对筛选出的候选基因的稳定性进行验证，发现当使用 *RPL*13 和 *RP*49 以及 *RP*49 和 *GAPDH* 作为内参基因时，*Orco* 及 *PBP*1 的表达量规律一致，并与桃蛀螟生活习性及前人研究结果一致；而使用 *ACT* 作为内参基因计算得到的 *Orco* 和 *PBP*1 表达量则不规律。【结论】在不同发育时期桃蛀螟基因定量研究中建议以 *RP*49 和 *GAPDH* 作为内参基因，而在桃蛀螟成虫不同组织中基因定量研究中建议以 *RPL*13 和 *RP*49 作为内参基因。

关键词：桃蛀螟；内参基因；基因筛选；表达稳定性；实时荧光定量 PCR

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2017)11-1266-12

Screening of reference genes for qRT-PCR in *Conogethes punctiferails* (Lepidoptera: Crambidae)

YANG Ling, HU Xiao-Jing, XU Zhi-Feng, HE Lin, XIAO Wei* (College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to screen and verify stably expressed genes under given conditions as reference genes for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in *Conogethes punctiferalis*, so as to provide the basis for quantitative studies of genes of this moth. 【Methods】Based on transcriptomics sequencing results in *C. punctiferalis* and reported reference genes in other insect species, six candidate genes including β-actin gene (*ACT*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*), ribosomal protein 49 gene (*RP*49), alpha tubulin gene (*α-tub*), ribosomal protein L13 gene (*RPL*13) and

基金项目：重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2013jcyjA80034)

作者简介：杨苓，女，1991 年 9 月生，四川自贡人，硕士研究生，研究方向为昆虫化学生态学，E-mail：yanglingzbxy@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sinoshawwe@hotmail.com

收稿日期 Received: 2017-06-17；接受日期 Accepted: 2017-09-13

vacuolar-type ATPase gene (*V-ATPase*) were cloned, and their expression levels in different developmental stages and different adult tissues were measured by qRT-PCR. Then the stabilities of these candidate genes were evaluated by a series of programs including ΔCt method, GeNorm, NormFinder, BestKeeper and an online program, RefFinder. Finally, the stabilities of selected reference genes were validated with an olfactory receptor co-receptor gene (*Orco*) and pheromone binding protein 1 gene (*PBP*1).【Results】Analyzed by four programs including ΔCt method, GeNorm, NormFinder and BestKeeper, similar rankings of six candidate genes were obtained, among which *RP*49, *RPL*13 and *GAPDH* were the most stable genes in different developmental stages and different adult tissues, and *ACT* was ranked as the least stable gene despite of experimental conditions by all programs. Comprehensive analysis with RefFinder further showed that in different adult tissues, *RPL*13 was the most stable gene, followed by *RP*49, and in different developmental stages, *RP*49 was the most stable gene, followed by *GAPDH*. Additionally, the optimal number of reference genes was calculated by GeNorm as 2. Finally, the stabilities of selected reference genes were validated with *Orco* and *PBP*1 as target genes. The results indicated that when two pairs of genes, *RPL*13 and *RP*49, and *RP*49 and *GAPDH*, were respectively used as reference genes, *Orco* and *PBP*1 showed reliable expression patterns, which were consistent with life habits of *C. punctiferalis* and the results of the previous research. The expression patterns of *Orco* and *PBP*1, however, were irregular when *ACT* was used as the reference gene.【Conclusion】In *C. punctiferalis*, two pairs of genes, *RPL*13 and *RP*49, and *RP*49 and *GAPDH*, are recommended as reference genes in different adult tissues and different developmental stages, respectively.

Key words: *Conogethes punctiferails*; reference genes; gene screening; expression stability; quantitative real-time PCR

桃蛀螟 *Conogethes punctiferails* 广泛分布于东亚、南亚、东南亚和澳大利亚和新西兰地区,其幼虫为害多种果树、作物和蔬菜(Waterhouse, 1993)。在中国,该虫的寄主植物达 100 多种,近年来为害玉米严重(鹿金秋等, 2010)。桃蛀螟以幼虫钻蛀为害,导致对该虫缺乏高效的杀虫剂,同时,基于性信息素的性诱剂产品的绿色高效防治方式,已经在桃蛀螟的防治和监测上得到广泛应用(任帅和郭素娟, 2015)。

实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)以其可靠性、特异性和高灵敏性的特征,在过去的几十年中被广泛用于基因定量分析(葛星等, 2013; 贾小俭等, 2015; Jia *et al*., 2016)。在 qRT-PCR 过程中,为了校准样品之间的差异,确保定量的准确性,需要使用合适的内参基因。内参基因往往是在不同个体及组织细胞中均稳定表达的看家基因,这些基因通常参与细胞的基本生命过程,比如微管蛋白(α-tub)、肌动蛋白(ACT)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和 18S rRNA 等基因(Daly *et al*., 1997; Thellin *et al*., 1999; Chen *et al*., 2005; Lu *et al*., 2013)。研究证实,这些看家基因的转录水平在不同条件下的稳定性是存在差异的(Jonge, 2007; Kozera and Rapacz, 2013),由此可知,当使用内参基因对目标基因的表达进行校准时,内参基因自身表达的稳定性必然会影响定量测定的准确性。因此,在一定条件下开展基因定量研究,应该筛选和验证在该条件下稳定表达的内参基因。另外,在内参基因的个数方面,使用两个甚至更多的内参基因,能够获得更准确的定量数据(Huang *et al*., 2015; Yang *et al*., 2015b; Ma *et al*., 2016)。

近年来,对桃蛀螟基因方面的研究逐渐开展,其中多数涉及到基因的定量分析(葛星等, 2013; 贾小俭等, 2015; Jia *et al*., 2016),然而,到目前为止尚未有桃蛀螟内参基因的筛选方面的报道。本研究选取桃蛀螟不同发育时期和成虫不同组织两种条件,对 6 个候选基因(*ACT*, *GAPDH*, *RP*49, *α-tub*, *RPL*13 和 *V-ATPase*)的转录水平进行定量分析,依据内参基因筛选鉴定的常用方法,使用 ΔCt 法, GeNorm, NormFinder, BestKeeper 和 RefFinder 5 种软件进行稳定性分析,最后,对筛选出的候选基因的稳定性进行验证。研究结果对桃蛀螟的基因定量研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试虫和样品

桃蛀螟室内种群的虫源采自重庆市合川区板栗园,在室内以玉米 *Zea mays* 饲养幼虫(Xiao *et al*., 2012)。饲养温度为 25 ± 1℃,相对湿度为 40% - 60%,光周期为 15L∶9D。以 15% 的蔗糖水供成虫补充营养。收集桃蛀螟的卵(85 mg)、2 龄(65 头)、3 龄(5 头)、5 龄幼虫(1 头) 分别混合、蛹(初期)和成虫(3 日龄)虫体(艾鹏鹏等, 2014)作为不同发育时期的样品。收集成虫头(60 个)、胸(15 个)、腹(3 个)、足(15 对)、翅(15 对)和触角(45 对)分别混合。将所有样品置于 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中,储存于 -80℃条件下用于 RNA 提取,每样品准备 3 个重复。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

使用动物组织总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN,中国)提取 1.1 节样品总 RNA。进行 DNA 酶处理以消除总 RNA 中的基因组 DNA 污染,最后溶于 30 μL ddH_2O(不含 RNase)中并在 -80℃下保存。提取 RNA 的浓度和纯度通过 BioTekEon 酶标仪(BioTek,美国)进行测定,其 260/280 nm 的 RNA 吸光度比值范围为 1.8 ~ 2.1。同时,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 完整性。然后每个样品取 1 μg RNA,按照 PrimeScript™ RT 试剂盒(TakaRa&Clontech,中国)要求的步骤合成第 1 链 cDNA。

1.3 内参基因的选择和克隆

参考其他昆虫内参基因(Lourenço *et al*., 2008; Lu *et al*., 2013; Zhai *et al*., 2014; Yang *et al*., 2015a; Ma *et al*., 2016),选取 6 个候选基因(表 1)。同时,根据桃蛀螟转录组的序列信息(*ACT* 除外),并通过 NCBI 比对其他蛾类中同源基因的相似性。

表 1 候选内参基因信息

Table 1 Candidate reference genes analyzed in this study

基因 Genes	基因全称 Full gene name	功能 Function	GenBank 登录号 GenBank accession no.
ACT	β-肌动蛋白 β-Actin	细胞骨架结构蛋白(调节细胞运动) Cytoskeletal structural protein (all cell; mediates cell motility)	JX1190141
GAPDH	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	糖酵解和糖异生作用中的氧化还原酶 Oxidoreductase in glycolysis and gluconeogenesis	KX668532
*RP*49	核糖体蛋白 49 Ribosomal protein 49	核糖体的结构成分 Structural constituent of ribosome	KX668533
α-tub	微管蛋白 Alpha tubulin	细胞骨架结构蛋白 Cytoskeletal structural protein (flagella, median body, ventral disc)	KX668534
*RPL*13	核糖体蛋白 L13 Ribosomal protein L13	催化蛋白质合成的细胞器 Organelles that catalyze protein synthesis	KX668535
V-ATPase	液泡型 ATP 合酶 Vacuolar-type ATPase	H^+ 泵入细胞管泡腔内或泵出细胞外,维持细胞内正常的生理活动 Rotary molecular motors that generally function as proton pumps	KX668536

通过 Primer Premier 5 (www. premierbiosoft. com)和 DNAMAN 8.0(www. lynnon. com)设计克隆引物,同时用 Primer 3 设计扩增引物(表 2)。PCR 扩增为 25 μL 体系: 50 ng cDNA(源自桃蛀螟 5 龄期幼虫), 2.5 μL 10 × PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+}), 62.5 mmol/L Mg^{2+}, 20 mmol/L dNTP, 0.5 U Taq 多聚酶(Takara,中国),引物 10 μmol/L。PCR 反应条件: 94℃预变性 3 min; 然后 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min,36 个循环;最后 72℃ 5 min,最后保存在 4℃。PCR 产物经 1% 凝胶电泳检测,凝胶提取试剂盒进行(OmegaBio-Tek, USA)纯化,然后克隆到 pGEM-T(Promega,美国)中进行测序。

表 2　候选内参基因克隆引物信息
Table 2　Information of cloning primers for candidate reference genes

基因 Genes	引物序列(5'-3') Primer sequences		长度(bp) Length
ACT	F：CACCCTGAAGTACCCCATCG	R：TGAGGTAGTCGGTCAAGTC	776
GAPDH	F：ATCGGTCGCCTGGTGCT	R：CGCCAATAAAGTCGGAAGA	822
*RP*49	F：AAAGGTTTATCCGCCATCA	R：TAGACGAGACGCCGTGAGC	263
α-tub	F：GGTCCGCACAGGCACAT	R：GGGCGGCTGGTAGTTGAT	849
*RPL*13	F：CCTGCCCGTGGACCTTT	R：CCGCTTGACAGCCTTGA	305
V-ATPase	F：AGAATGAGGACAAGTTCGGTTAT	R：GCCCACGATGGATACGG	1183

1.4　qTR-PCR 检测候选内参基因

qRT-PCR 的引物信息见表 3。qRT-PCR 反应体系为 20 μL：2 × SYBR Green MasterMix(Promega,美国)10 μL，ddH$_2$O 7 μL，10 μmol/L 引物，cDNA 样品(桃蛀螟不同发育时期及成虫不同组织)50 ng。每个样品设置 2 个技术重复和 3 个生物重复。扩增步骤：95℃预变性 2 min；然后进行 40 个循环：95℃变性 15 s，60℃退火 30 s；最后在 60℃下延伸 5 s。使用以下公式计算扩增效率：E = [10^(-1/slope) -1] × 100%。获得具有单峰的熔解曲线，并以其确认扩增后每个引物对的特异性以及是否具有引物二聚体。

1.5　基因表达稳定性分析

通过软件 GeNorm，NormFinder，BestKeeper，RefFinder 以及相对 ΔCt 法，根据平均循环阈值(Ct 值，3 个生物重复)分析基因表达的稳定性(Vandesompele *et al*.，2002；Andersen *et al*.，2004；Pfaffl *et al*.，2004；Silver *et al*.，2006；Xie *et al*.，2011)。GeNorm 和 NormFinder 需要输入相对定量值(从原始 Ct 值转换)，而不是绝对定量循环值(Cq)。GeNorm 计算内参基因表达稳定性的 M 值，根据 M 值大小对内参基因的稳定性进行排名，同时 GeNorm 还可以计算一定条件下的内参基因的最佳数目(Vandesompele *et al*.，2002)。NormFinder 则通过计算不同样本组内和组间变化来评估基因的稳定性。另外，根据组间的稳定性，NormFinder 还可以确定两个基因的最佳组合。BestKeeper 根据每个基因 Cq 值的标准偏差和变异系数对各个基因进行排名。而 ΔCt 方法是通过两两比较每个样品中基因的相对表达量以鉴定最佳基因。经过以上 4 个软件分析之后，再利用在线程序 RefFinder(http://fulxie.0fees.us/? type = reference)，对所有候选基因的稳定性进行综合排名。

1.6　内参基因稳定性验证

以桃蛀螟的非典型气味受体基因 *Orco* 和性信息素结合蛋白基因 *PBP*1 作为目标基因，分别以软件分析出的最稳定/最不稳定的基因作为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *Orco* 和 *PBP*1 的相对表达量($P < 0.01$，邓肯新复极差检验)(Livak and Schmittgen，2001)，验证候选基因的稳定性。

2　结果

2.1　候选基因的克隆

通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因的扩增产物，经纯化和克隆后，通过测序获得基因序列，与 NCBI 数据库比对，确定克隆基因的正确性。

2.2　引物的扩增效率及特异性评价

qRT-PCR 结果显示，每个候选基因的溶解曲线均呈现单一峰，表明定量引物具有良好的特异性。同时，基于各浓度内参基因的 cDNA 获得的标准曲线具有良好的决定系数($R^2 > 0.91$)，PCR 效率也在 96.8819% ~ 110.1300% 之间(表 3)，表明候选基因的定量引物设计合理，能够用于相应基因的定量测定。

2.3　候选内参基因的表达水平分析

在桃蛀螟不同发育时期和成虫不同组织中两个特定条件下，每个候选基因的 Ct 值如图 1 所示。所有基因的 Ct 值均高于 10(14 ~ 22)，表明各候选基因在虫体内均具有较高的表达水平。同时各个基因的表达量之间存在差异，其中 *ACT* 和 *V-ATPase* 的 Ct 值较高，而 *RP*49 较低，其余 3 个基因居中。在所有的 6 个基因中，*RPL*13 表达量变化最小，其次是 *GAPDH* 和 *RP*49，而 *ACT* 的 Ct 值变化最大。

表 3 候选内参基因 qRT-PCR 引物的扩增效率

Table 3 Amplification efficiency of primers used in qRT-PCR of candidate reference genes

基因 Genes	引物序列(5'–3') Primer sequences	扩增产物长度(bp) Amplification size	扩增效率(%) Amplification efficiency	线性相关系数 R^2 Correlation coefficient
ACT	F: CACCCTGAAGTACCCCATCG R: TGAGGTAGTCGGTCAAGTC	374	96.8819	0.984
GAPDH	F: ATGTCGTCGGAGTCAACCTT R: ACCAGTGGAAGCAGGAATGA	245	102.5886	0.9912
*RP*49	F: GCGTAACTGGCGTAAACCC R: GCGGACGTTGTGTACTAGTA	154	103.5765	0.9836
α-tub	F: TCACTGGTAAGGAGGATGCG R: TAGATCGCGAACTCCAGCTT	238	100.5972	0.9851
*RPL*13	F: GCTCCGAGTCTTCTGTCTGA R: GGATGACTGCTGTGAAGGGA	221	102.7519	0.9902
V-ATPase	F: TGGTGGGAGAAATCATCCGT R: GCTCGTTGATGTCCTTCAGC	186	103.6685	0.993
Orco	F: ATGATGAACAAAGTGAAAGCC R: ACCCGGTACAAGTGACGGTACG	200	100.0000	0.98335
*PBP*1	F: ATGGAGCTGATGACGCCAC R: CCAAGATCTCTGCCAACACG	180	110.1300	0.91784

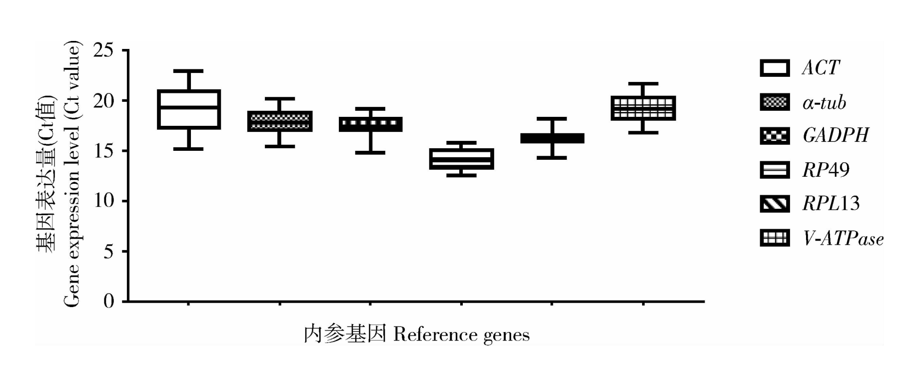


图 1 内参基因的 Ct 值分布图

Fig. 1 Ct values distribution of reference genes

上图表示候选内参基因在桃蛀螟不同发育时期及成虫不同组织中的 Ct 值分布的箱型图,样本数为 36。The figure shows the box diagram of Ct value distribution in different developmental stages and different adult tissues of *Conogethes punctiferails*, and the number of samples was 36.

2.4 不同条件下内参基因稳定性分析

2.4.1 ΔCt 和 GeNorm 分析:ΔCt 法利用基因的稳定性与 ΔCt 值的标准偏差值成反比的原理,通过对候选基因的 ΔCt 值的标准偏差进行两两比较,对基因表达的稳定性进行排序。结果显示,在成虫不同组织中,*RPL*13 的稳定性最高,其次是 *RP*49 和 *GAPDH*。同时,最不稳定的基因为 *ACT*(图 2:A)。而在不同发育时期中,*RP*49 则为最稳定的基因,而 *ACT* 同样最不稳定(图 2:B)。

与 ΔCt 法相似,GeNorm 法对各个基因稳定性的排序也是依据成对比较,所以 GeNorm 的排序结果与 ΔCt 法基本一致。如图 2(C)和 2(D)所示,在成虫不同组织中最稳定的基因依次是 *RPL*13 和 *RP*49,在不同发育时期则是 *RP*49 和 *GAPDH*,而最不稳定的基因则仍然是 *ACT*。

2.4.2 NormFinder 分析和 BestKeeper 分析:NormFinder 通过比较样本的组内变异和组间变异来评估基因的稳定性。NormFinder 分析表明,在不同发育时期和成虫不同组织两个条件下,最稳定均为为 *RPL*13,其次为 *GAPDH*,而 *ACT* 则为最不稳定基因(图 3:A, B)。

Bestkeeper 则根据 Ct 值的标准差来分析基因的稳定性。结果显示,*RP*49 在两个条件下均表现为最稳定的基因。而 *ACT* 的稳定性最低,与其他软件的结果相同。

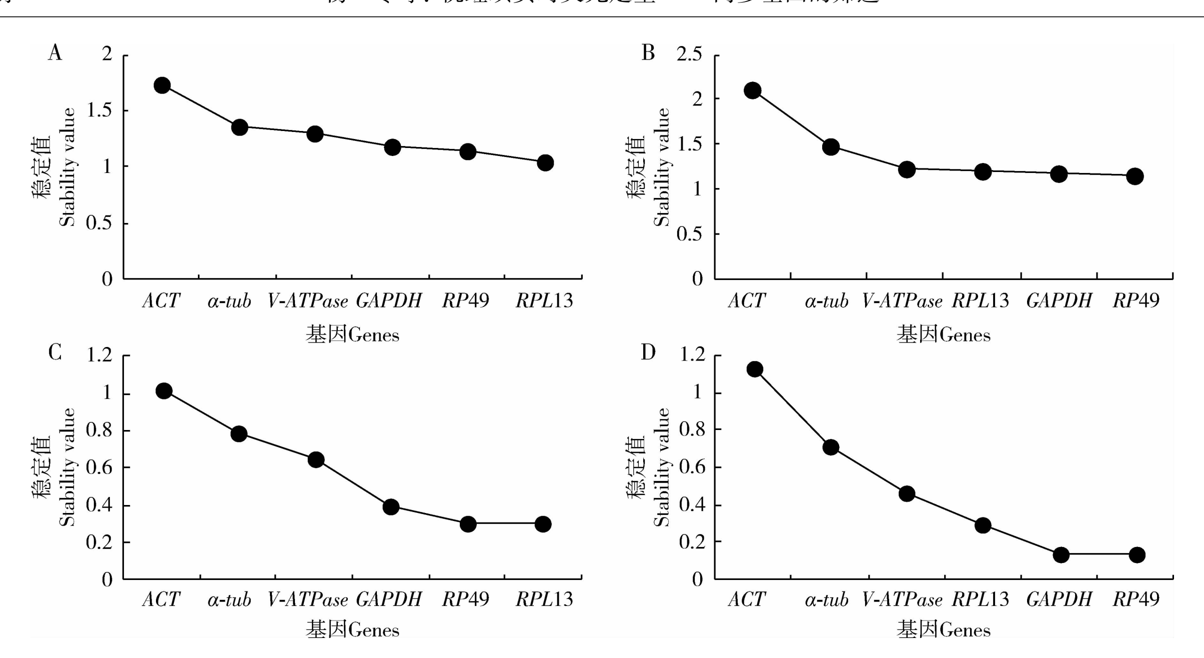


图 2　桃蛀螟成虫不同组织(A 和 C)和不同发育时期(B 和 D)候选内参基因的稳定性分析

Fig. 2　Stability analysis of candidate reference genes in different adult tissues (A and C) and different developmental stages (B and D) of *Conogethes punctiferails*

A 和 B 采用 ΔCt 法,C 和 D 采用 GeNorm 软件分析。ΔCt method was used for A and B, and GeNorm program for C and D.

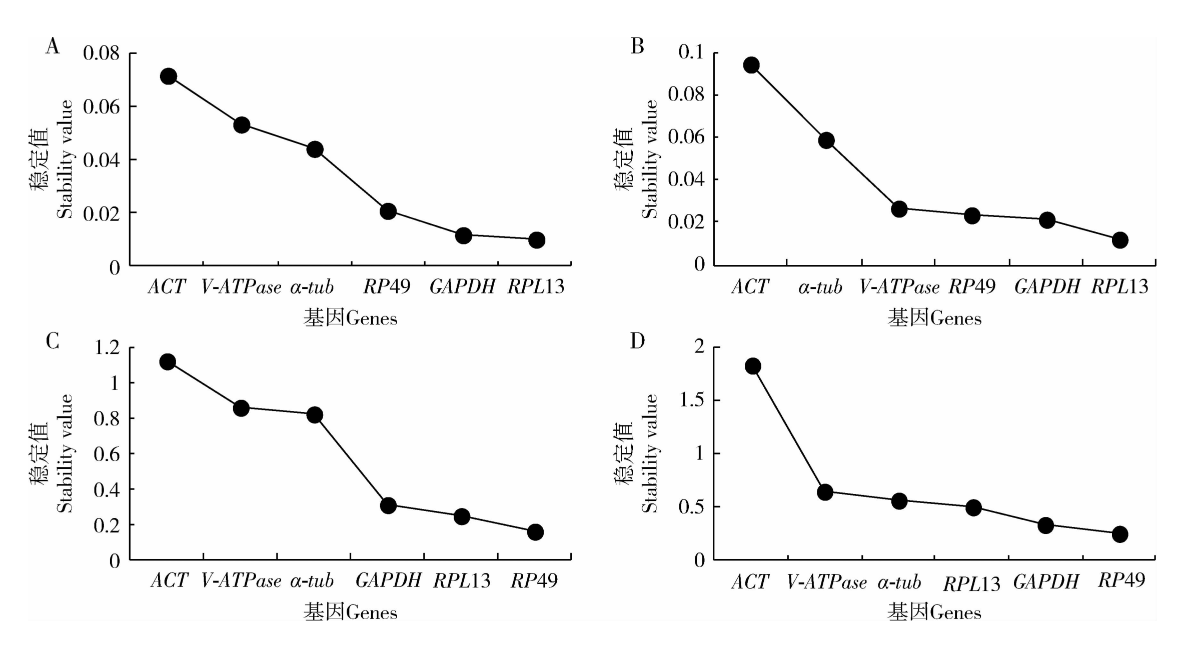


图 3　桃蛀螟成虫不同组织(A 和 C)和不同发育时期(B 和 D)候选内参基因的稳定性分析

Fig. 3　Stability analysis of candidate reference genes in different adult tissues (A and C) and different developmental stages (B and D) of *Conogethes punctiferails*

A 和 B 采用 NormFinder 软件分析,C 和 D 采用 BestKeeper 软件分析。NormFinder program was used for A and B, and BestKeeper program for C and D.

2.4.3　RefFinder 分析：经过以上 4 个软件的独立分析之后,再利用在线程序 RefFinder 综合评估内参基因的稳定性并进行排名(Xie *et al*., 2011)。结果显示,在成虫不同组织中,最稳定的基因为 *RPL*13,其次为 *RP*49 和 *GAPDH*,最不稳定的为 *ACT*(图 4：A)。对于不同发育时期,最稳定的基因为 *RP*49,其次为 *GAPDH* 和 *RPL*13,*ACT* 则依然为最不稳定的基因(图 4：B)。

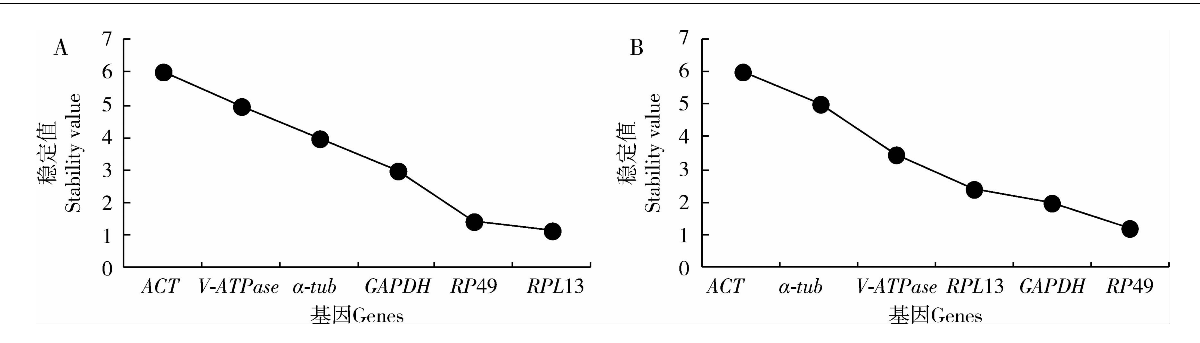


图 4 RefFinder 软件分析桃蛀螟成虫不同组织(A)和不同发育时期(B)候选内参基因的稳定性

Fig. 4 Stability analysis of candidate reference genes in different adult tissues (A) and different developmental stages (B) of *Conogethes punctiferails* by using RefFinder analysis

2.5 内参基因最佳数目的确定

利用 GeNorm 软件通过判断配对变异值(低于 0.15)来确定内参基因最佳数目,即当 Vn/(n+1)<0.15 时,说明该条件下最佳内参基因的数目为 n 个。软件分析结果如图 5 所示,在不同发育时期和成虫不同组织条件下,只有 V2/3 的配对变异值低于 0.15,说明内参基因的最佳数目为 2,在以上两种条件下进行基因定量工作时,最好使用 2 个内参基因。因此,结合以上内参基因稳定性分析的结果可知,在成虫不同组织条件下,可以使用 *RP*49 和 *RPL*13 作为内参基因,而在不同发育时期中则可以使用 *RP*49 和 *GAPDH* 作为内参基因。

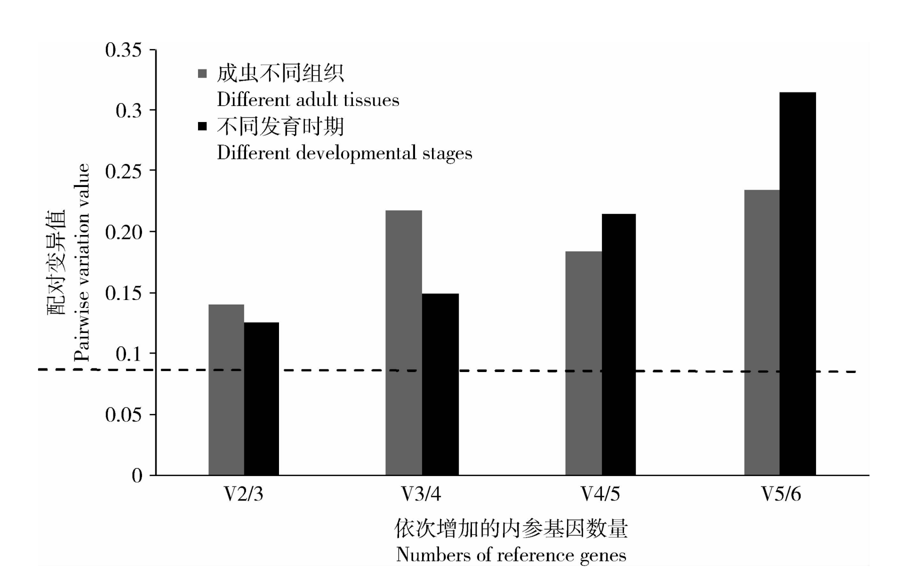


图 5 桃蛀螟成虫不同组织和不同发育时期内参基因的最佳数量评估

Fig. 5 Evaluation of the optimal number of reference genes for normalization in different adult tissues and developmental stages of *Conogethes punctiferalis*

虚线表示配对变异值为 0.15。The dashed line indicates that the pairwise variation is 0.15.

2.6 内参基因稳定性的验证

在对候选内参基因的稳定性进行软件分析之后,需要对分析结果进行验证。在本实验中,首先选择在昆虫中广泛分布的嗅觉关键基因 *Orco* 作为目的基因,以候选基因(不同发育时期:*GAPDH* 和 *RP*49;成虫组织:*RP*49 和 *RPL*13,以及最不稳定的基因 *ACT*)作为内参基因,测定目的基因在不同发育时期和不同组织两种条件下的表达量。结果如图 6(A)所示,以 *RP*49 和 *RPL*13 为内参基因时,目的基因 *Orco* 表达量在成虫的 6 个不同组织之间均无显著性差异,在触角中的表达量远高于其他组织;以 *ACT* 为内参基因时,*Orco* 表达量在头部及翅部均分别显著高于以 *RP*49 和 *RPL*13 为内参基因时的表达量。相似的结果也出现在不同发育时期的条件下(图 6: B),以 *GAPDH*, *RP*49 以及 *ACT* 为内参基因时, *Orco* 基因在成虫期的表达量均为其他发育时期

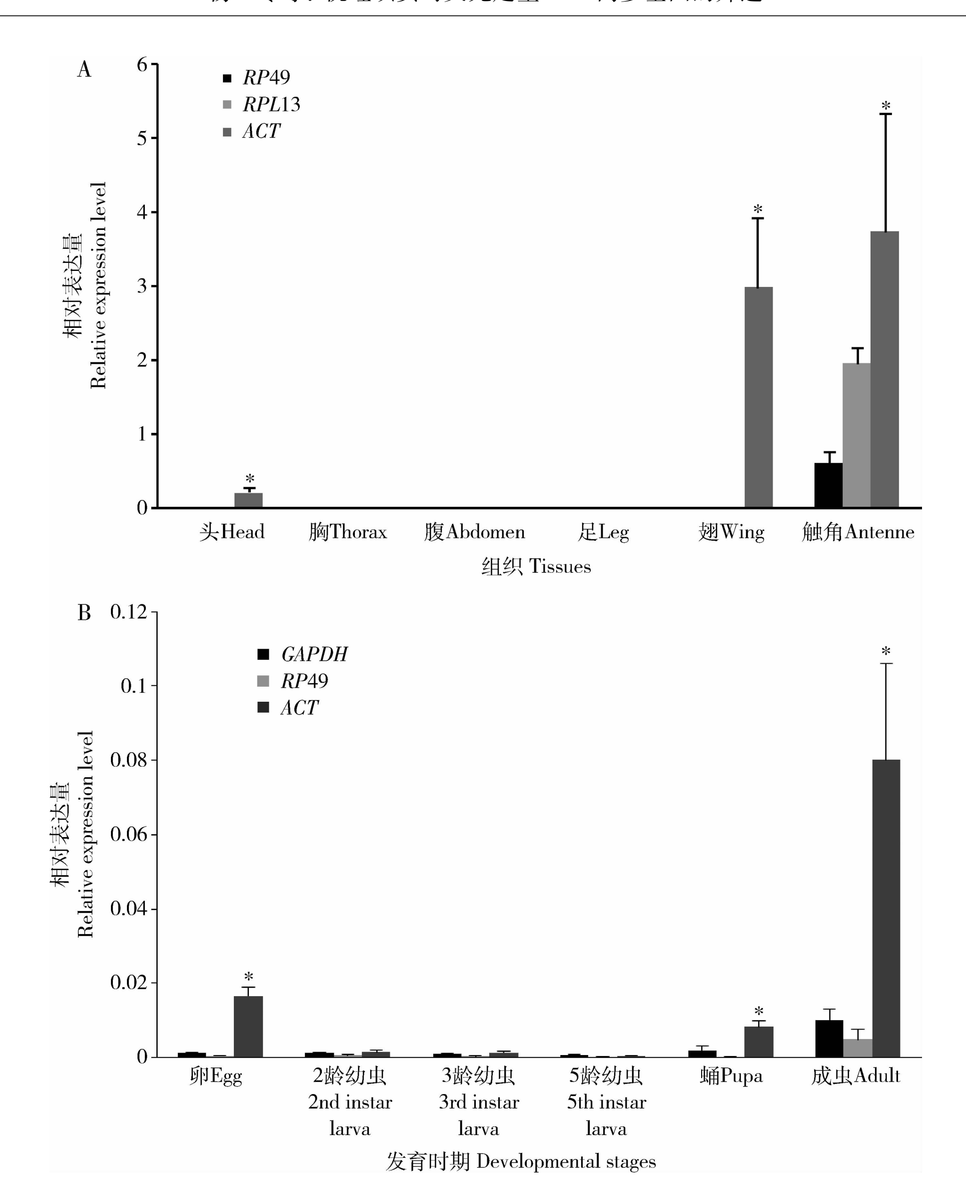


图 6　*Orco* 在桃蛀螟成虫不同组织中(A)和不同发育时期(B)的表达水平

Fig. 6　Expression level of *Orco* in different adult tissues (A) and different developmental stages (B) of *Conogethes punctiferalis*

A 和 B 图分别以 *RP*49, *RPL*13 和 *ACT* 及 *GAPDH*, *RP*49 和 *ACT* 为内参基因。图中数据为平均值 ± 标准差。柱上星号示同一组织或发育时期不同内参基因间差异显著($P<0.01$, 邓肯新复极差检验)。*RP*49, *RPL*13 and *ACT* (A) and *GAPDH*, *RP*49 and *ACT* (B) were used as reference genes in Figs. A and B, respectively. Data in the figure are mean ± *SD*. Asterisk above bars means significant difference ($P<0.01$, Duncan's test) between different internal reference genes in the same tissue or the same developmental stage.

(卵,2 龄幼虫,3 龄幼虫,5 龄幼虫和蛹)的 2 倍以上;以 *GAPDH* 和 *RP*49 为内参基因时,*Orco* 的表达量在每个发育阶段之间均无显著差异,以 *ACT* 为内参时 *Orco* 表达量而在卵及蛹期均显著高于以 *GAPDH* 和 *RP*49 为内参基因时的表达量。

为客观反映最适内参基因的适用性,以 *PBP*1 为目的基因,进一步检测了 *RP*49, *RPL*13, *GAPDH* 和 ACT 4 个内参基因在桃蛀螟成虫不同组织中和不同发育时期的表达量。结果如图 7(A)所示,以 *RP*49 和 *RPL*13 为内参基因测得的 *PBP*1 表达量在成虫的 6 个不同组织之间均无显著差异;以 *ACT* 为内参基因时,*PBP*1 在头部和腹部的表达量分别显著高于以 *RP*49 和 *RPL*13 为内参基因时的表达量。由图 7(B)可见,在以 *GAPDH* 和 *RP*49 为内参基因测得的 *PBP*1 表达量在卵、2 龄幼虫、3 龄幼虫、5 龄幼虫和蛹之间均无显著差异,以 *ACT* 为内参基因时,*PBP*1 在卵及 3 龄幼虫期的表达量均显著高于以 *GAPDH* 和 *RP*49 为内参基因的表达量。

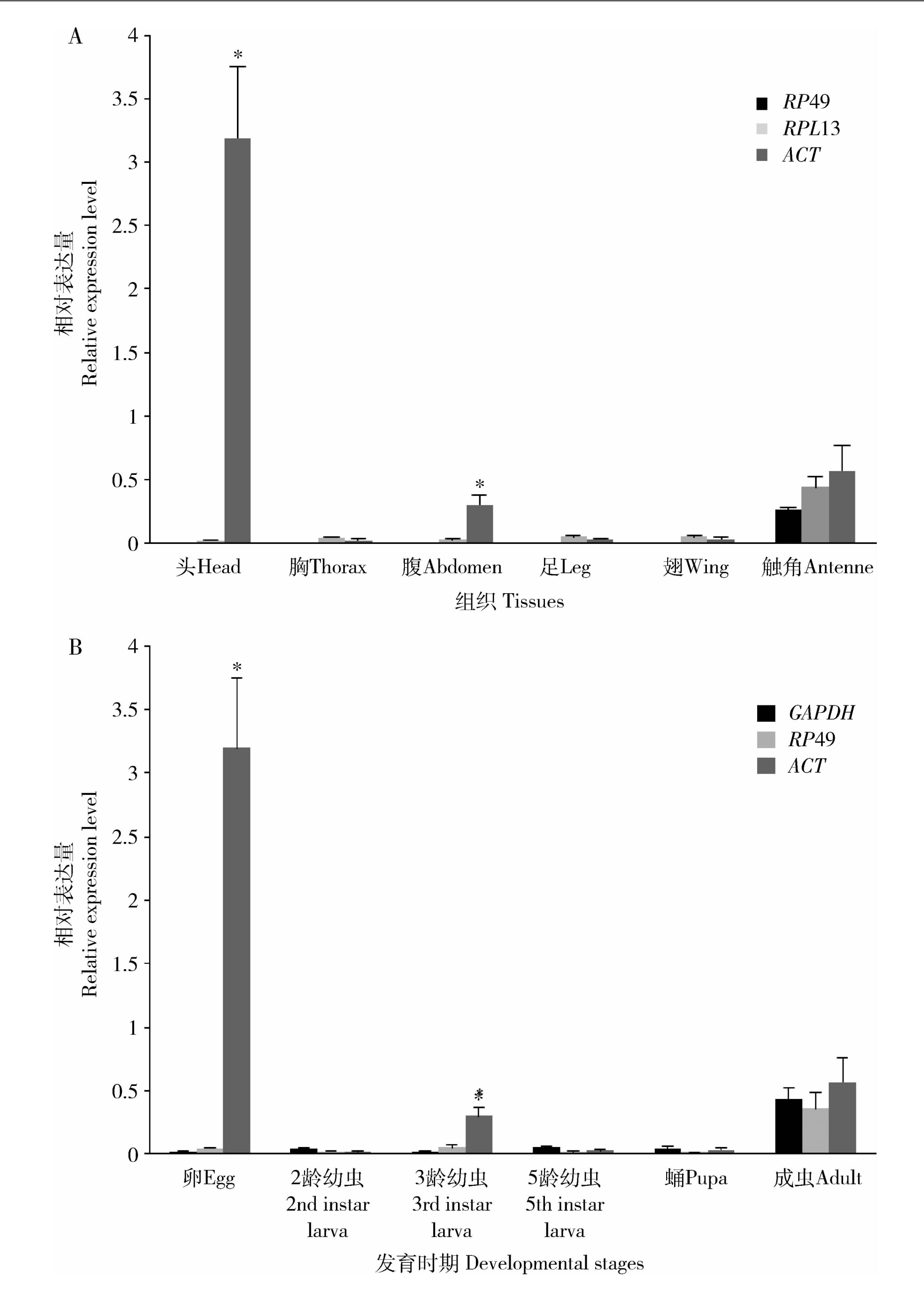


图 7 *PBP*1 在桃蛀螟成虫不同组织中(A)和不同发育时期(B)的表达水平

Fig. 7 Expression level of *PBP*1 in different adult tissues (A) and different developmental stages (B) of *Conogethes punctiferalis*
A 和 B 图分别以 *RP*49, *RPL*13 和 *ACT* 及 *GAPDH*, *RP*49 和 *ACT* 为内参基因。柱上星号示同一组织或发育时期不同内参基因间差异显著($P<0.01$, 邓肯新复极差检验)。*RP*49, *RPL*13 and *ACT* (A) and *GAPDH*, *RP*49 and *ACT* (B) were used as reference genes in Figs. A and B, respectively. Data in the figure are mean ± *SD*. Asterisk above bars means significant difference ($P<0.01$, Duncan's test) between different internal reference genes in the same tissue or the same developmental stage.

3 讨论

qRT-PCR 是基因表达分析研究中的重要技术，该技术采用相对定量的方法对基因的表达量进行检测(Guan and Yang, 2008)，即以内参基因作为标准校准目的基因的表达量，具有灵敏度高，重复性好的特点，目前已成为基因表达研究中检测或比较 mRNA 水平的标准技术。目前在多种昆虫中都进行过内参基因的筛选，如家蚕 *Bombyx mori* (Peng *et al*., 2012)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Yuan *et al*., 2014)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (刘金泊等, 2014)、小菜蛾 *Plutella Xylostella*(符伟等, 2012)、二斑叶螨 *Tetranychus urticae*(Morales *et al*., 2016)和瓜

实蝇 *Bactrocera Cucurbitae*（周世豪等，2016）。本研究基于桃蛀螟转录组的测序数据（Xiao *et al.*, 2016），并参考其他昆虫常用的候选内参基因，通过软件分析基因表达稳定性，在不同发育时期和成虫不同身体部位两种条件下，筛选出桃蛀螟的内参基因。

候选内参基因的稳定性分析，常采用系列软件依据相关参数分析各个基因的稳定性，并根据稳定性高低进行排序。本研究首先使用 4 个软件进行独立排序，发现 *RP*49，*GAPDH* 和 *RPL*13 是 6 个候选基因中最稳定的 3 个基因，只是由于不同软件的计算原理不相同，给出的 3 个基因的稳定性高低略有差异（图 2 和 3）。进一步通过在线程序 RefFinder 给出了候选基因的综合排名：在不同发育时期，最稳定的基因为 *RP*49，其次为 *GAPDH*。而在成虫不同身体部位条件下，最稳定的基因是 *RPL*13，其次为 *RP*49（图 4）。在其他昆虫或螨中，*RPL*13，*RP*49 和 *GAPDH* 的表达量通常比较稳定（Lourenço *et al.*, 2008；Van Hiel *et al.*, 2009；Yang *et al.*, 2015a）。另外，对于稳定性最差的基因，4 个软件的单独排序结果与在线程序 RefFinder 的综合排序结果完全相同，均为 *ACT*。该基因在樱桃果蝇 *Drosophila suzukii* 和朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus mite* 的内参基因筛选中，也被评估为最不稳定的基因（Sun *et al.*, 2010；Zhai *et al.*, 2014）。当然，在有的物种中 *ACT* 也被评估为最佳内参基因（Lu *et al.*, 2013；Shang *et al.*, 2015）。这些结果进一步表明，内参基因的表达稳定性因不同物种而不同，同时也受到实验条件的影响。

在分析了候选基因表达的稳定性之后，进一步使用 GeNorm 软件计算出桃蛀螟内参基因的最佳个数为 2 个。在基因表达研究中，通常使用单一的内参基因（Deng *et al.*, 2016；Liu *et al.*, 2016）。然而，近年来，多个内参基因被广泛应用，由此能提高对目的基因定量的准确性（Vandesompele *et al.*, 2002）。因此，在桃蛀螟的基因定量研究中，为提高定量的准确性，在不同发育时期和成虫不同组织的条件下，也推荐使用 2 个内参基因。因此，建议将 *RPL*13 和 *RP*49 作为成虫不同身体组织条件下的内参基因，而将 *RP*49 和 *GAPDH* 作为不同发育时期条件下的内参基因。

最后，以重要的嗅觉受体基因 *Orco* 和 *PBP*1 验证了两对基因 *RPL*13 和 *RP*49 以及 *RP*49 和 *GAPDH* 的稳定性。结果发现，分别以两对内参基因为基准测得的 *Orco* 及 *PBP*1 表达量，具有一致的表达趋势，即在触角和成虫阶段高表达，在其余组织中和发育时期的表达量相对较低（图 6：A, B）。在蛾类昆虫的嗅觉中，成虫阶段以触角为主的嗅觉行为具有非常重要的作用（Stengl and Funk, 2013；Carraher *et al.*, 2015），在本实验中，采用 *RPL*13 和 *RP*49 以及 *RP*49 和 *GAPDH* 两对内参基因对 *Orco* 和 *PBP*1 的定量结果符合蛾类昆虫的嗅觉规律。而另一方面，当使用 *ACT* 作为内参时，*Orco* 和 *PBP*1 的定量结果在两个条件下的均不稳定，说明 *ACT* 确实不适合作为桃蛀螟的内参基因。

本研究从桃蛀螟 5 龄幼虫中克隆了 *ACT*，*GAPDH*，*RP*49，*α-tub*，*RPL*13 和 *V-ATPase* 6 个内参基因，通过 ΔCt 法，GeNorm，BestKeeper，NormFinder 和 RefFinder 软件，分析了各个基因的稳定性。结果发现在不同发育时期，最稳定的基因为 *RP*49，其次为 *GAPDH*。而在成虫不同组织中，最稳定的基因是 *RPL*13，其次为 *RP*49。在两种条件下进行桃蛀螟的基因定量研究时，为得到更准确的定量结果，建议使用 2 个内参基因。在不同发育时期条件下建议使用 *RP*49 和 *GAPDH*，在成虫不同身体部位条件下建议使用 *RPL*13 和 *RP*49。本研究结果有利于进一步揭示桃蛀螟嗅觉相关的分子机理，即定量分析嗅觉基因的 mRNA 表达水平，从而为后续 RNA 干扰等相关研究奠定基础。

参考文献（References）

Ai PP, Yang R, Zhang MZ, Sun SL, Du YL, 2014. A preliminary observation of the morphological characters of different stages of *Conogethes punctiferails* (Guenée). *J. Beijing Agric. Univ.*, 29(3): 53–55. [艾鹏鹏，杨瑞，张民照，孙淑玲，杜艳丽，2014. 桃蛀螟各虫态形态学特征观察. 北京农学院学报，29(3): 53–55]

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF, 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 64: 5245–5250.

Carraher C, Dalziel J, Jordan MD, Christie DL, Newcomb RD, Kralicek AV, 2015. Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 66: 31–41.

Chen YT, Jiang GC, Wang DL, 2005. 18srRNA acting as an internal standard of semi-quantitative RT-PCR in the study of LSCC-3, a lung cancer related gene. *J. Guangxi Med. Univ.*, 22: 209–212.

Daly S, Yacoub A, Dundon W, Mastromei G, Islam K, Lorenzetti R, 1997. Isolation and characterization of a gene encoding alpha-

tubulin from *Candida albicans*. *Gene*, 187(2): 151 - 158.

Deng LT, Wu YL, Li JC, Ouyang KX, Ding MM, Zhang JJ, Li SQ, Lin MF, Chen HB, Hu XS, 2016. Screening reliable reference genes for RT-qPCR analysis of gene expression in *Moringa oleifera*. *PLoS ONE*, 11(8): e0159458.

Fu W, Xie W, Zhang Z, Wu QJ, Wang SL, Zhang YJ, 2012. Selection of valid reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to Bt toxin. *Acta Entomol. Sin.*, 55(12): 1406 - 1412. [符伟, 谢文, 张卓, 吴青君, 王少丽, 张友军, 2012. Bt 毒素诱导下小菜蛾实时定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 55(12): 1406 - 1412]

Ge X, Zhang TT, He KL, Wang QY, Li YL, Wang ZY, 2013. Cloning and tissue expression profiling of the olfactory receptor co-receptor gene in adults of *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(3): 243 - 250. [葛星, 张天涛, 何康来, 王勤英, 李云龙, 王振营, 2013. 桃蛀螟成虫 *Orco* 嗅觉受体基因的克隆及组织表达谱分析. 昆虫学报, 56(3): 243 - 250]

Guan H, Yang K, 2008. RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR. In: Yang K ed. Methods in Molecular Biology, Vol. 456: Adipose Tissue Protocols, Second Edition. Humana Press, Totowa, NJ. 259 - 270.

Huang XN, Gao YC, Jiang B, Zhou ZC, Zhan AB, 2015. Reference gene selection for quantitative gene expression studies during biological invasions: a test on multiple genes and tissues in a model ascidian *Ciona savignyi*. *Gene*, 576(1): 79 - 87.

Jia XJ, Hao SD, Du YL, Zhang MZ, Qin XC, Wang JZ, Wang HX, Ji WR, 2015. cDNA cloning, expression profiling and binding affinity assay of the pheromone binding protein Cpun-PBP1 in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(11): 1167 - 1176. [贾小俭, 郝少东, 杜艳丽, 张民照, 覃晓春, 王进忠, 王海香, 冀卫荣, 2015. 桃蛀螟性信息素结合蛋白的 cDNA 克隆、表达谱及其与配体化合物的结合特性分析. 昆虫学报, 58(11): 1167 - 1176]

Jia XJ, Wang HX, Yan ZG, Zhang MZ, Wei CH, Qin XC, Ji WR, Falabella P, Du YL, 2016. Antennal transcriptome and differential expression of olfactory genes in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Sci. Rep.*, 6: 29067.

Jonge HJMD, Fehrmann RSN, Bont ESJMD, 2007. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE*, 2(9): e898.

Kozera B, Rapacz M, 2013. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.*, 54(4): 391 - 406.

Liu JB, Ou J, Yao FJ, He L, Xi GS, Wei ZM, 2014. Identification of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Tribolium castaneum* after exposure to phosphine. *J. Agric. Biotechn.*, 22: 257 - 264. [刘金泊, 欧静, 姚富姣, 何磊, 奚耕思, 魏朝明, 2014. 磷化氢诱导下赤拟谷盗实时定量 PCR 内参基因的筛选. 农业生物技术学报, 22(2): 257 - 264]

Liu Q, Lei K, Ma Q, Qiao F, Li ZC, An LH, 2016. Ribosomal protein L7 as a suitable reference gene for quantifying gene expression in gastropod *Bellamya aeruginosa*. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 43: 120 - 127.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402 - 408.

Lourenço AP, Mackert A, Cristino ADS, Simões ZLP, 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39(3): 372 - 385.

Lu J, Wang Z, He K, Liu Y, 2010. Research history, progresses and prospects in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis*. *Plant Prot.*, 36(2): 31 - 38. [鹿金秋, 王振营, 何康来, 刘勇, 2010. 桃蛀螟研究的历史、现状与展望. 植物保护, 36(2): 31 - 38]

Lu YH, Yuan M, Gao XW, Kang TH, Zhan S, Wan H, Li JH, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.

Ma KS, Li F, Liang PZ, Chen XW, Liu Y, Gao XW, 2016. Identification and validation of reference genes for the normalization of gene expression data in qRT-PCR analysis in *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). *J. Insect Sci.*, 16(1): 17.

Morales MA, Mendoza BM, Lavine LC, Lavine MD, Walsh DB, Zhu F, 2016. Selection of reference genes for expression studies of xenobiotic adaptation in *Tetranychus urticae*. *Int. J. Biol. Sci.*, 12: 1129 - 1139.

Peng R, Zhai Y, Ding H, DiT, Zhang T, Li B, Shen W, Wei Z, 2012. Analysis of reference gene expression for real-time PCR based on relative quantitation and dual spike-in strategy in the silkworm *Bombyx mori*. *Acta Bioch. Bioph. Sin.*, 44: 614 - 622.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 26: 509 - 515.

Ren S, Guo SJ, 2015. Study on the applied technology of *Conogethes punctiferalis*' sex pheromone in chestnut orchard. *J. Environm. Insects*, 37(1): 96 - 101. [任帅, 郭素娟, 2015. 桃蛀螟性信息素在板栗园中应用技术的研究. 环境昆虫学报, 37(1): 96 - 101]

Shang F, Wei DD, Jiang XZ, Wei D, Shen GM, Feng YC, Li T, Wang JJ, 2015. Reference gene validation for quantitative PCR under various biotic and abiotic stress conditions in *Toxoptera citricida* (Hemiptera, Aphidiae). *J. Econ. Entomol.*, 108(4): 2040 - 2047.

Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL, 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.*, 7: 33.

Stengl M, Funk NW, 2013. The role of the coreceptor *Orco* in insect olfactory transduction. *J. Comp. Physiol.*, 199: 897 - 909.

Sun W, Jin Y, He L, Lu W, Li M, 2010. Suitable reference gene selection for different strains and developmental stages of the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*, using quantitative real-time PCR. *J. Insect Sci.*, 10(208): 1 - 12.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De BB, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E, 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 75(2–3): 291–295.

Van Hiel MB, Van Wielendaele P, Temmerman L, Van Soest S, Vuerinckx K, Huybrechts R, Vanden Broeck J, Simonet G, 2009. Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. *BMC Mol. Biol.*, 10: 56.

Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe AD, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3(7): research0034.1–0034.11.

Waterhouse DF, 1993. The Major Arthropod Pests and Weeds of Agriculture in Southeast Asia: Distribution, Importance and Origin. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra Australia. 139 pp.

Xiao W, Matsuyama S, Ando T, Millar JG, Honda H, 2012. Unsaturated cuticular hydrocarbons synergize responses to sex attractant pheromone in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis*. *J. Chem. Ecol.*, 38: 1143–1150.

Xiao W, Yang L, Xu ZF, He L, 2016. Transcriptomics and identification of candidate chemosensory genes in antennae of *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Asia-Pac. Entomol.*, 19: 911–920.

Xie FL, Sun GL, Stiller JW, Zhang BH, 2011. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database. *PLoS ONE*, 6(11): e26980.

Yang C, Pan H, Liu Y, Zhou X, 2015a. Stably expressed housekeeping genes across developmental stages in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *PLoS ONE*, 10(3): e0120833.

Yang CX, Pan HP, Noland JE, Zhang DY, Zhang ZH, Liu Y, Zhou XG, 2015b. Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in a predatory biological control agent, *Coleomegilla maculate* (Coleoptera: Coccinellidae). *Sci. Rep.*, 5: 18201.

Yuan M, Lu YH, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin BR, Li JH, 2014. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS ONE*, 9(1): e86503.

Zhai Y, Lin Q, Zhou X, Zhang X, Liu T, Yu Y, 2014. Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *PLoS ONE*, 9(9): e106800.

Zhou SH, Li L, Fu YG, 2016. Selection of reference genes in *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) under high temperature stress. *Chin. J. Trop. Crops*, 37(1): 131–135. [周世豪, 李磊, 符悦冠, 2016. 高温胁迫下瓜实蝇的内参基因筛选. 热带作物学报, 37(1): 131–135]

（责任编辑：马丽萍）